

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Juli 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/061708 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/10**,
C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/012819

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. November 2004 (12.11.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 58 137.5 12. Dezember 2003 (12.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MICHELSSEN, Uwe**
[DE/DE]; Am Drachenstein 17, 69469 Weinheim (DE).
HOLSCHUH, Karl [DE/DE]; Weinberg Strasse 16,
64342 Seeheim-Jugenheim (DE). **SCHWÄMMLE,**
Achim [DE/DE]; Holzstrasse 1, 64283 Darmstadt (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**;
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND KIT FOR ISOLATING RNA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND KIT ZUR ISOLIERUNG VON RNA

(57) Abstract: The invention relates to a method and kit for isolating RNA in the presence of DNA. The isolation ensues by binding to a solid phase consisting of magnetite, whereby the binding buffer produces a concentration of guanidinium thiocyanate of > 2.5 mol/l, and a specified concentration of phosphate exists during the binding.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit zur Isolierung von RNA in Anwesenheit von DNA. Die Isolierung erfolgt durch Bindung an eine Festphase aus Magnetit, wobei der Bindepuffer eine Konzentration von Guanidiniumthiocyanat von > 2,5 Mol/l erzeugt und während der Bindung eine bestimmte Konzentration an Phosphat vorliegt.



WO 2005/061708 A1

Verfahren und Kit zur Isolierung von RNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit zur Isolierung von RNA in Anwesenheit von DNA durch spezifische Bindung an Magnetit-Träger.

5

Die Anreicherung bzw. Reinigung und Isolierung von verschiedenen Nukleisäurespezies wie doppelsträngiger Plasmid DNA, chromosomaler DNA, einzelsträngiger DNA, DNA Fragmenten oder RNA ist von zentraler Bedeutung in der Molekularbiologie. Seit langem ist eine Vielzahl von Methoden bekannt, um die verschiedenen DNA Spezies, die in einer Probe vorkommen können, voneinander zu trennen. Hierbei kommen Verfahren auf rein flüssig-chemischer Basis zum Einsatz oder auch verschiedene Verfahren mit Hilfe von spezifisch modifizierten Festphasen zur Bindung der Nukleinsäuren.

15

Besonderes Interesse hat in den letzten Jahren die Analyse der RNA erfahren, da insbesondere die RNA Moleküle durch ihre vielfältigen Funktionen den biologischen Zustand einer Zelle widerspiegeln. Zum Anderen sind bedeutende pathogene Viren mit RNA Genomen ausgestattet, die es mittels der molekularen Diagnostik quantitativ und qualitativ nachzuweisen gilt.

20

Ein rein flüssig-chemisches Verfahren für die spezifische Isolierung von RNA Molekülen beschreibt US 4,843,155. Die Methode macht sich das unterschiedliche Lösungsverhalten von DNA und RNA zunutze. Jedoch kommen hierbei hochgiftige Substanzen wie Phenol oder Chloroform zum Einsatz. Zudem müssen zeitaufwendige Fällungsreaktionen mit Alkohol und Zentrifugationen durchgeführt werden.

25

US 5,234,809 und US 6,355,792 beschreiben den Einsatz einer Festphase zur Isolierung von DNA und RNA. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Nukleinsäure-Spezies ist nicht möglich.

30

WO 92/18514 und WO 01/46404 beschreiben ähnliche Verfahren zur Isolierung von DNA/RNA, bei denen metallische Oxide wie z.B. Magnetit als Festphase eingesetzt werden.

5

Es wurde nun gefunden, dass unmodifizierte Magnetit-Partikel unter bestimmten chaotropen Bedingungen spezifisch und effektiv RNA-Moleküle binden, wohingegen DNA-Moleküle im Überstand verbleiben. Dies ist insbesondere überraschend, da in der Literatur (M. J. Davies et al.,
10 Analytical Biochemistry 262, 92-94 (1998), WO 92/18514 und WO 01/46404) ebensolche Magnetit-Träger zur Isolierung von DNA verwendet werden.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Isolierung von RNA aus Proben gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

20

- a) Bereitstellung einer Festphase aus Magnetit
- b) Bereitstellung eines Bindepuffers, der Guanidiniumthiocyanat (GTC) in einer Konzentration enthält, die nach Mischung mit der Probe eine
Endkonzentration von $> 2,5$ M Guanidiniumthiocyanat bewirkt;
- c) Herstellung einer Mischung aus der Probe, der Festphase aus Magnetit und dem Bindepuffer, wobei in dieser Mischung eine die Bindung der RNA unterstützende Phosphat-Konzentration vorliegt;
- d) Isolierung der Festphase mit der gebundenen RNA

25

In einer bevorzugten Ausführungsform wird im Anschluß an die Isolierung der Festphase mit der gebundenen RNA (Schritt d))

- e) die besagte Festphase optional gewaschen und
- f) die RNA von der Festphase eluiert.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Elution in Schritt e) mit Elutionspuffern, die einen pH-Bereich > 7 ermöglichen und Phosphat enthalten.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Bindepuffer zusätzlich Chelatoren wie EDTA.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform besteht die Festphase aus partikulärem Magnetit. Besonders bevorzugt sind Magnetit-Partikel mit einem Durchmesser von 0,01 bis 2 µm und einer spezifischen Oberfläche von 1 bis 100 m²/g.

- 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit zur Isolierung von RNA nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zumindest enthaltend eine Festphase aus Magnetit und einen Bindepuffer mit einer GTC-Konzentration von über 3 Mol/l.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Bindepuffer zumindest zwischen 4 und 8 Mol/l GTC, zwischen 5 und 200 mMol/l EDTA und typischerweise zwischen 10 und 100 mMol/l Tris-HCl oder ähnliche Puffersubstanzen.

- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit zusätzlich einen oder mehrere der folgenden Bestandteile
- einen Elutionspuffer
 - einen Waschpuffer
 - eine Phosphatsalzlösung

- 30 Proben im Sinne der Erfindung sind jede Art von Proben, in denen RNA vermutet wird. Die Probe kann synthetischen oder bevorzugt gentechnologischen, biotechnologischen oder biologischen Ursprungs sein,

d.h. z.B. aus Bakterien, Viren, Körperzellen, Blut, Plasma, Zerebrospinalflüssigkeit, Harn, Feces, Milch, Gewebe, Fermentationsbrühe oder Zellkulturen.

5 Die Probe kann direkt eingesetzt werden oder falls notwendig zuerst aufgeschlossen werden. Beispielsweise müssen Proben, die Zellen oder virale Partikel enthalten zunächst aufgeschlossen werden, um die RNA aus den Zellen bzw. Partikeln freizusetzen. Geeignete Methoden zum Aufschluß der Proben bzw. Lyse von Zellen sind dem Fachmann bekannt.

10 RNA ist jede natürliche oder synthetische Form der Ribonukleinsäure, insbesondere m-RNA, t-RNA, ribosomale RNA, virale RNA oder synthetische RNA Moleküle wie siRNA (RNAi).

15 Der Begriff "Phosphat" umschließt erfindungsgemäß anorganisches Phosphat und organisches Phosphat. Beispiele hierfür sind Phosphatsalze wie Natriumhydrogenphosphat (anorganisches Phosphat) oder phosphathaltige Kohlenwasserstoffverbindungen wie Aminosäuren, Kreatinphosphat und phosphathaltige Proteine (organisches Phosphat).

20 Eine Festphase aus Magnetit ist ein Träger, dessen Oberfläche zumindest größtenteils, bevorzugt vollständig, aus Magnetit (Fe_3O_4) besteht. Die Festphase kann beispielsweise als Platte, Partikel, Beschichtung, Faser, Filter oder andere bevorzugt poröse Struktur vorliegen. Besonders bevorzugt besteht die Festphase aus Magnetit-Partikeln.

25 Zur Herstellung von Magnetit-Partikeln sind verschiedene Herstellverfahren bekannt. Beispiele sind offenbart in:

- Massart, IEEE Trans. Magn. 17, 1247-1248 (1981)
- Sugimoto, Matijevic, J. Colloid Interface Sci. 74, 227-243 (1980)
- Qu et al., J. Colloid Interface Sci. 215, 190-192 (1999)

30 Besonders bevorzugt erfolgt die Herstellung der Festphase aus Magnetit nach Sugimoto und Matijevic.

In der Regel bindet 1 mg derartiger Partikel ca. 10 µg RNA. Da die meisten Proben weniger als 1 µg RNA enthalten, werden typischerweise für die erfindungsgemäße Isolierung von RNA 0,5 bis 5 mg, bevorzugt ca. 1 mg, Partikel eingesetzt.

5

Kern der vorliegenden Erfindung ist, dass RNA in wässrigen Lösungen in Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat (GTC) und Phosphat an Festphasen aus Magnetit bindet, während DNA in Lösung bleibt. Auf diese Weise können in der Regel mehr als 70%, häufig mehr als 90% der in der

10

Probe vorhandenen RNA spezifisch isoliert werden.

Um die Bindung der RNA zu gewährleisten muß der wässrige Bindepuffer bei der Mischung mit der Probe und der Festphase eine Konzentration von mindestens 2,5 M GTC, bevorzugt 3-5 M GTC, ermöglichen. Dazu werden

15

je nach dem Volumenverhältnis der Probe und des Bindepuffers bevorzugt Bindepuffer mit einer Konzentration von über 3 M, bevorzugt 5 bis 8 M GTC eingesetzt.

Die spezifische Bindung der RNA findet unter geeigneten Bedingungen in einem breiten pH Bereich statt. Bevorzugt stellt der Bindungspuffer einen pH-Bereich von 6 - 10 ein, besonders bevorzugt von pH 7 - 9. Daher enthält der Bindepuffer Puffersubstanzen, die dies ermöglichen. Dem Fachmann sind geeignete Puffersubstanzen bekannt. Beispiele hierfür sind Tris-HCl, Tricine, MOPS und andere.

20

25

Essentiell für die spezifische Isolierung der RNA ist das Vorhandensein einer bestimmten Menge an Phosphat während der Bindung an die Magnetit-Festphase.

Liegt während der Bindung (d.h. bei Mischung der Probe mit dem Bindepuffer und der Festphase) kein Phosphat vor, binden in der Regel

30

sowohl DNA als auch RNA an das Magnetit. Liegt während der Bindung zuviel Phosphat vor, so binden weder DNA noch RNA.

5 Die Menge an Phosphat, die zur Unterstützung der spezifischen Bindung der RNA notwendig ist, hängt von der Größe der Oberfläche der Festphase aus Magnetit ab. Wahrscheinlich ist der Grund für diesen Zusammenhang eine Wechselwirkung zwischen der Oberfläche der Festphase und dem Phosphat. Die Menge an Phosphat muss ausreichend groß sein, um die Bindung der DNA an die Oberfläche der Festphase zu verhindern, darf aber
10 nicht so groß sein, dass das Phosphat die Bindung der RNA stört.

Wie beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt, bewirkt eine Konzentration von 20mM Phosphat pro mg der bevorzugt eingesetzten Magnetit-Partikel (Merck MagPrep® Magnetit, Art.Nr. 101882, d.h. Partikel mit Durchmesser
15 ca. 1 μm , spezifischer Oberfläche ca. 20 m^2/g , hergestellt nach Sugimoto, Matijevic, J. Colloid Interface Sci. 74, 227-243 (1980)) eine spezifische und effiziente Bindung der RNA an die Festphase aus Magnetit. Die DNA verbleibt in Lösung.

Für eine effiziente Bindung der RNA sollte die Phosphat-Konzentration
20 nicht größer sein als 200mM pro mg der benutzten Magnetit-Partikel.

Die zur Unterstützung der spezifischen Bindung der RNA notwendige Menge an Phosphat kann dem Gemisch durch entsprechende Zusätze zum Bindepuffer zugesetzt werden. Genauso kann jedoch auch die Probe selbst
25 bereits Phosphat enthalten, wie es für Körperflüssigkeiten wie Urin oder Blutplasma, das Phosphat in anorganischer und in Protein-gebundener Form enthält, bekannt ist. In diesem Falle kann durch das Mengenverhältnis von Probe und Bindepuffer und/oder der Menge an Magnetit die notwendige Phosphatmenge für die spezifische RNA Bindung
30 eingestellt werden. Dies ist beispielhaft in Abbildung 2 dargestellt.

Somit bedeutet die Angabe, dass die Mischung aus Bindepuffer, wässriger Probe und Festphase eine „die spezifische Bindung der RNA unterstützende“ Phosphat-Konzentration enthält erfindungsgemäß, dass die Mischung soviel anorganisches und/oder organisches Phosphat enthält, dass eine Bindung der DNA verhindert und eine Bindung der RNA unterstützt wird.

Bei Proben biologischen Ursprungs müssen die Nukleinsäure-haltigen Zellen oder Viren lysiert werden, um die RNA gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens quantitativ anzureichern. Zur Unterstützung der Lyse benützt der Fachmann unter anderem nicht-ionische Detergenzien, wie NP 40, Tween[®] 20 oder Triton[®] X-100. Diese nicht-ionischen Detergenzien können die Effizienz der erfindungsgemäßen RNA-Isolierung negativ beeinflussen. Es wurde jedoch gefunden, dass dieser negative Einfluss durch einen Zusatz von Chelatoren wie EDTA aufgehoben wird.

Daher enthält der Bindepuffer und/oder die Probe erfindungsgemäß bevorzugt zusätzlich Chelatoren wie EDTA. Bevorzugt liegt die Konzentration an Chelatoren während der Bindung zwischen 5 und 200 mMol/l. Daher enthält der Bindepuffer typischerweise zwischen 5 und 200 mMol/l, bevorzugt zwischen 10 und 100 mMol/l Chelatoren. Zudem kann der Bindepuffer weitere Substanzen wie Stabilisatoren, Enzyminhibitoren etc. enthalten.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Probe typischerweise zunächst mit dem Bindepuffer gemischt und dann mit der Festphase versetzt. Die Suspension aus Probe, Bindepuffer und Festphase wird gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 60 Minuten, typischerweise ca. 10 Minuten, wird der Überstand sorgfältig abgetrennt.

Die Festphase wird optional z.B. mit einem sauren Waschpuffer, wie er beispielsweise in US 6,355,792 offenbart ist, gewaschen.

Falls eine Isolierung der RNA gewünscht wird, wird nach erneuter Separation und Entfernung des Überstands die Festphase im Elutionspuffer resuspendiert, gut durchmischt und 3 bis 60, typischerweise 10 Minuten, inkubiert. Nach Abtrennen der Festphase kann der Überstand mit der RNA zur weiteren Analyse verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit zur Isolierung von RNA mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens. Der Kit enthält eine Festphase aus Magnetit und einen Bindepuffer mit einer Konzentration von mindestens 3 Mol/l GTC. Weiterhin enthält der Kit bevorzugt zusätzlich Waschpuffer und Elutionspuffer sowie eine Phosphatsalzlösung für das Einstellen des notwendigen Phosphatgehaltes einer Probe.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Bindepuffer zumindest GTC in einer Konzentration zwischen 4 und 8 Mol/l, EDTA in einer Konzentration zwischen 5 und 200 mMol/l und als Puffersubstanz typischerweise Tris-HCl in einer Konzentration zwischen 10 und 100 mMol/l.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit als Festphase Magnetit-Partikel hergestellt nach Sugimoto, Matijevic, J. Colloid Interface Sci. 74, 227-243 (1980).

Somit liefern das erfindungsgemäße Verfahren sowie der erfindungsgemäße Kit erstmals eine effektive und quantitative Möglichkeit zur Festphasen-unterstützten Isolierung von RNA aus Proben in Anwesenheit von DNA.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die

bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

- 5 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, insbesondere der korrespondierenden Anmeldung DE 10358137.5, eingereicht am 12.12.2003, ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

10

Beispiele

Beispiel 1

- 15 1mg MagPrep[®] Magnetit Partikel (Merck KGaA) werden mit einem Mix von 500µl Bindepuffer B (5M Guanidinium Thiocyanat + 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 20mM EDTA + 1% Triton[®]X 100), DNA (200ng linearisierte Plasmid-DNA) und RNA (200ng 16S/23S-RNA) gemischt. Der Mix wurde zuvor mit steigenden Mengen Natriumphosphat versetzt.
- 20 Nach 10 Minuten Inkubation wird magnetisiert und der Überstand sorgfältig abgetrennt. Nach Entfernung des Magnetfeldes werden die Partikel mit 500µl Waschpuffer AT (10mM Acetat-Tris pH 4.0) resuspendiert und bis zu 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 25 Nach Magnetisierung wird der Überstand sorgfältig entfernt und wieder mit 500µl Waschpuffer AT versetzt. Nach Entfernung des Magnetfeldes werden die Partikel resuspendiert, magnetisiert und der Überstand verworfen. Die Elution der Nukleinsäuren von den Partikeln erfolgt nach 10-minütiger Inkubation in 100µl Elutionspuffer P (10mM Tris-HCl pH 8,5 +1mM EDTA + 50mM Natriumhydrogenphosphat) bei 50°C. Nach Magnetisierung wird das Eluat in ein neues, steriles Gefäß transferiert.
- 30 Die Konzentration der DNA und RNA wird durch eine Fluoreszenzmessung mit PicoGreen[®] und RiboGreen[®] (Molecular Probes) gemäß den Angaben

des Herstellers quantifiziert. Die Abbildung 1 zeigt die Ausbeute an DNA und RNA in Abhängigkeit zur Phosphat-Konzentration. Auf der Abszisse ist die Phosphatkonzentration, auf der Ordinate die Wiederfindungsrate von DNA und RNA in % angegeben.

5

Es ist klar ersichtlich, dass die Bindung der DNA schon bei Anwesenheit geringer Mengen an Phosphat stark abnimmt. Dagegen bindet die RNA bei 2 bis 50 mM Phosphat effizient.

10 **Beispiel 2**

1mg MagPrep® Magnetit Partikel (Merck KGaA) werden mit einem Mix von 500µl Bindepuffer B (5M Guanidinium Thiocyanat + 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 20mM EDTA + 1% Triton®X 100), DNA (200ng linearisierte Plasmid-DNA) und RNA (200ng 16S/23S-RNA) gemischt. Der Mix wurde zuvor mit

15

steigenden Mengen Human-Plasma versetzt.

Die weiteren Schritte sind in Beispiel 1 beschrieben.

Die Abbildung 2 zeigt die Ausbeute an DNA und RNA in Abhängigkeit zur Plasmakonzentration. Auf der Abszisse ist die Menge an zugegebenem Plasma, auf der Ordinate die Wiederfindungsrate in % angegeben.

20

Da Plasma phosphorylierte Proteine und anorganisches Phosphat enthält, zeigt sich bei Zusatz von Plasma das gleiche Bild wie bei Zusatz von anorganischem Phosphat (Beispiel 1). Dies zeigt, dass in vielen Fällen, in denen die Probe bereits anorganisches und/oder organisches Phosphat

25

enthält, ein weiterer Zusatz von Phosphatsalzen nicht notwendig ist.

Beispiel 3

1mg MagPrep® Magnetit Partikel (Merck KGaA) werden mit 500µl von vier verschiedenen Bindepuffern

30

5M Guanidinium Thiocyanat, (GTC) oder
5M Guanidinium-HCl, (GHCl)) oder

5M Natrium Thiocyanat, (NaTC) oder

5M Natriumperchlorat, (NaClO)

gemischt. Alle Bindepuffer enthalten DNA (200ng linearisierte Plasmid-DNA) und RNA (200ng 16S/23S-RNA) sowie 3mg/ml Rinderserumalbumin.

5 Die weiteren Schritte sind in Beispiel 1 beschrieben.

Die Abbildung 3 zeigt die Ausbeute an DNA und RNA in Abhängigkeit von dem eingesetzten chaotropen Salz. Die spezifische Bindung der RNA erfolgt nur in Gegenwart von Guanidiniumthiocyanat.

10

15

20

25

30

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von RNA aus Proben, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - 5 a) Bereitstellung einer Festphase aus Magnetit
 - b) Bereitstellung eines Bindepuffers, der Guanidiniumthiocyanat in einer Konzentration enthält, die nach Mischung mit der Probe eine Endkonzentration von $> 2,5$ M Guanidiniumthiocyanat bewirkt;
 - 10 c) Mischen der Probe mit der Festphase aus Magnetit und dem Bindepuffer, wobei in dieser Mischung eine die Bindung der RNA unterstützende Phosphat-Konzentration vorliegt;
 - d) Isolierung der Festphase mit der gebundenen RNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Anschluß
15 an Schritt d) die Festphase optional gewaschen wird und anschließend die RNA von der Festphase eluiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Elution mit Elutionspuffern erfolgt, die einen pH-Bereich > 7 ermöglichen und
20 Phosphat enthalten.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindepuffer zusätzlich Chelatoren wie EDTA
25 enthält.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase aus Magnetit-Partikeln mit einem Durchmesser von $0,01$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$ und einer spezifischen Oberfläche von $1 - 100\text{ m}^2/\text{g}$ besteht.
30
6. Kit zur Isolierung von RNA nach dem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zumindest enthaltend eine Festphase aus

Magnetit und einen Bindepuffer mit einer GTC-Konzentration von über 3 Mol/l.

5 7. Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindepuffer
zumindest zwischen 4 und 8 Mol/l GTC und zwischen 5 und 200 mMol/l
EDTA enthält.

8. Kit nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Kit
zusätzlich einen oder mehrere der folgenden Bestandteile enthält

10 - einen Elutionspuffer
- einen Waschpuffer
- eine Phosphatsalzlösung.

15

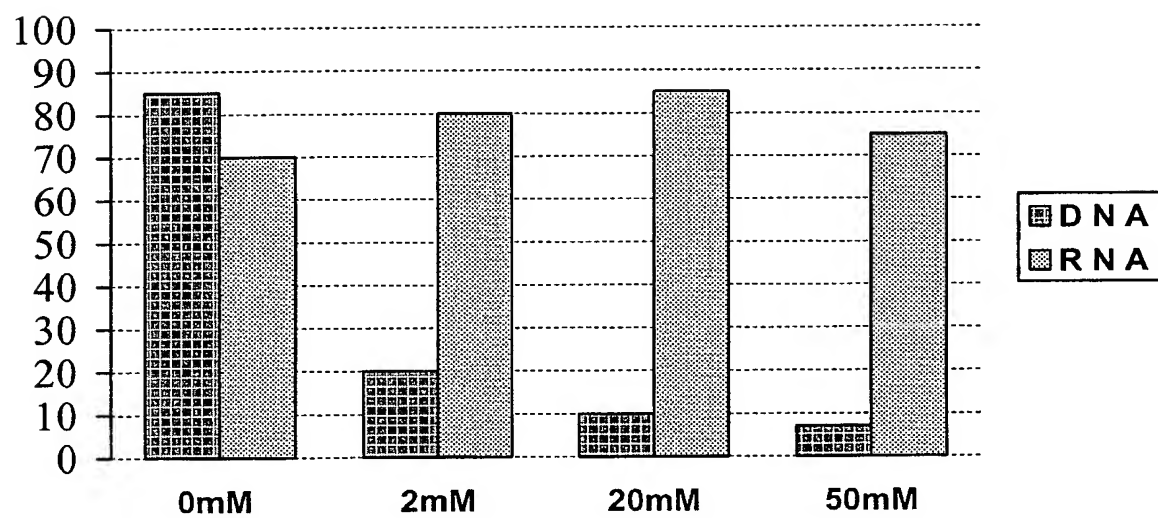
20

25

30

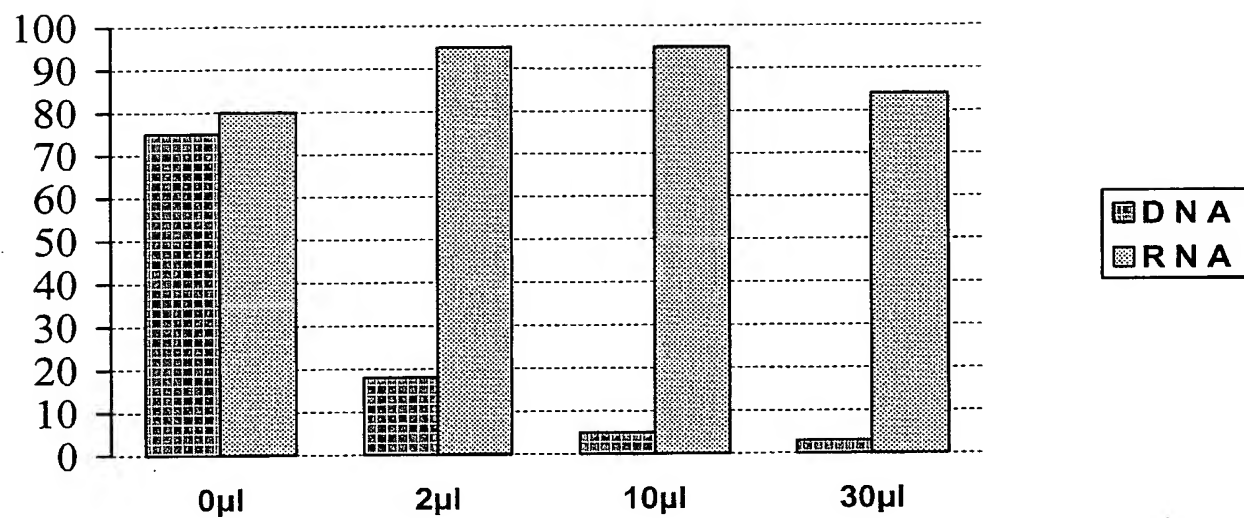
1/3

Fig. 1



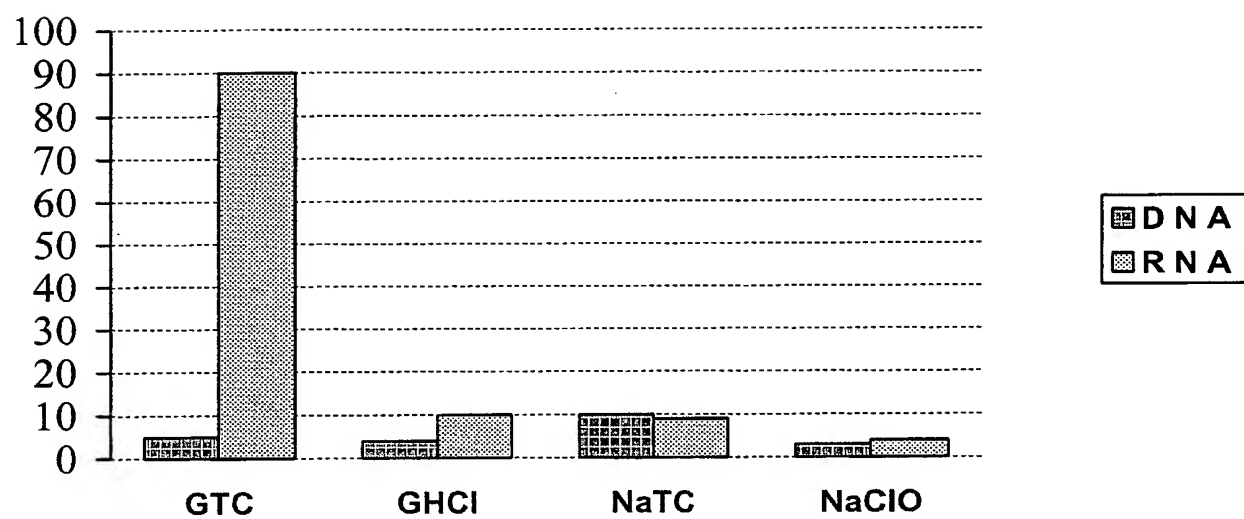
2/3

Fig. 2



3/3

Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012819

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIES MARTIN J ET AL: "Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 262, no. 1, 15 August 1998 (1998-08-15), pages 92-94, XP002321531 ISSN: 0003-2697 the whole document	1-8
A	EP 1 002 860 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 24 May 2000 (2000-05-24) example 5	1-8
A	WO 98/31840 A (PROMEGA CORPORATION) 23 July 1998 (1998-07-23) pages 1-5; example 6	1-8
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2005

Date of mailing of the international search report

06/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012819

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/70040 A (PROMEGA CORPORATION) 23 November 2000 (2000-11-23) pages 1-5; example 9 -----	1-8
A	EP 0 389 063 A (AKZO N.V.; AKZO NOBEL N.V) 26 September 1990 (1990-09-26) the whole document -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012819

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1002860	A	24-05-2000	US 5973138 A	26-10-1999
			AU 771249 B2	18-03-2004
			AU 5707399 A	01-06-2000
			CA 2287730 A1	30-04-2000
			EP 1002860 A1	24-05-2000
			JP 2000159791 A	13-06-2000
			US 6433160 B1	13-08-2002
WO 9831840	A	23-07-1998	US 6027945 A	22-02-2000
			AU 732756 B2	26-04-2001
			AU 6647598 A	07-08-1998
			BR 9805897 A	24-08-1999
			CA 2249393 A1	23-07-1998
			DE 69817484 D1	02-10-2003
			DE 69817484 T2	17-06-2004
			DE 895546 T1	17-10-2002
			EP 1367137 A1	03-12-2003
			EP 0895546 A1	10-02-1999
			JP 3253638 B2	04-02-2002
			JP 11509742 T	31-08-1999
			US 2002086326 A1	04-07-2002
			WO 9831840 A1	23-07-1998
			US 6673631 B1	06-01-2004
			US 6368800 B1	09-04-2002
			US 2004086930 A1	06-05-2004
WO 0070040	A	23-11-2000	AU 778486 B2	09-12-2004
			AU 2398100 A	05-12-2000
			CA 2372485 A1	23-11-2000
			EP 1179058 A1	13-02-2002
			JP 2002543835 T	24-12-2002
			WO 0070040 A1	23-11-2000
			US 6284470 B1	04-09-2001
EP 0389063	A	26-09-1990	US 6787307 B1	07-09-2004
			NL 8900725 A	16-10-1990
			AT 156830 T	15-08-1997
			AU 641641 B2	30-09-1993
			AU 5215390 A	27-09-1990
			CA 2012777 A1	23-09-1990
			CA 2271603 A1	23-09-1990
			DE 69031237 D1	18-09-1997
			DE 69031237 T2	02-01-1998
			DE 389063 T1	10-10-1996
			DK 389063 T3	30-03-1998
			EP 0389063 A2	26-09-1990
			EP 0819696 A2	21-01-1998
			ES 2085245 T1	01-06-1996
			GR 96300019 T1	31-03-1996
			GR 3025351 T3	27-02-1998
			JP 2289596 A	29-11-1990
			JP 2680462 B2	19-11-1997
			JP 10072485 A	17-03-1998
			JP 2001078790 A	27-03-2001
			KR 148693 B1	01-08-1998
			US 5234809 A	10-08-1993
			ZA 9002190 A	24-12-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012819

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DAVIES MARTIN J ET AL: "Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 1, 15. August 1998 (1998-08-15), Seiten 92-94, XP002321531 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	1-8
A	EP 1 002 860 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 24. Mai 2000 (2000-05-24) Beispiel 5	1-8
A	WO 98/31840 A (PROMEGA CORPORATION) 23. Juli 1998 (1998-07-23) Seiten 1-5; Beispiel 6	1-8
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. März 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012819

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00/70040 A (PROMEGA CORPORATION) 23. November 2000 (2000-11-23) Seiten 1-5; Beispiel 9 -----	1-8
A	EP 0 389 063 A (AKZO N.V.; AKZO NOBEL N.V) 26. September 1990 (1990-09-26) das ganze Dokument -----	1-8

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012819

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1002860	A	24-05-2000	US 5973138 A 26-10-1999
		AU 771249 B2 18-03-2004	
		AU 5707399 A 01-06-2000	
		CA 2287730 A1 30-04-2000	
		EP 1002860 A1 24-05-2000	
		JP 2000159791 A 13-06-2000	
		US 6433160 B1 13-08-2002	
WO 9831840	A	23-07-1998	US 6027945 A 22-02-2000
		AU 732756 B2 26-04-2001	
		AU 6647598 A 07-08-1998	
		BR 9805897 A 24-08-1999	
		CA 2249393 A1 23-07-1998	
		DE 69817484 D1 02-10-2003	
		DE 69817484 T2 17-06-2004	
		DE 895546 T1 17-10-2002	
		EP 1367137 A1 03-12-2003	
		EP 0895546 A1 10-02-1999	
		JP 3253638 B2 04-02-2002	
		JP 11509742 T 31-08-1999	
		US 2002086326 A1 04-07-2002	
		WO 9831840 A1 23-07-1998	
		US 6673631 B1 06-01-2004	
		US 6368800 B1 09-04-2002	
		US 2004086930 A1 06-05-2004	
WO 0070040	A	23-11-2000	AU 778486 B2 09-12-2004
		AU 2398100 A 05-12-2000	
		CA 2372485 A1 23-11-2000	
		EP 1179058 A1 13-02-2002	
		JP 2002543835 T 24-12-2002	
		WO 0070040 A1 23-11-2000	
		US 6284470 B1 04-09-2001	
		US 6787307 B1 07-09-2004	
EP 0389063	A	26-09-1990	NL 8900725 A 16-10-1990
		AT 156830 T 15-08-1997	
		AU 641641 B2 30-09-1993	
		AU 5215390 A 27-09-1990	
		CA 2012777 A1 23-09-1990	
		CA 2271603 A1 23-09-1990	
		DE 69031237 D1 18-09-1997	
		DE 69031237 T2 02-01-1998	
		DE 389063 T1 10-10-1996	
		DK 389063 T3 30-03-1998	
		EP 0389063 A2 26-09-1990	
		EP 0819696 A2 21-01-1998	
		ES 2085245 T1 01-06-1996	
		GR 96300019 T1 31-03-1996	
		GR 3025351 T3 27-02-1998	
		JP 2289596 A 29-11-1990	
		JP 2680462 B2 19-11-1997	
		JP 10072485 A 17-03-1998	
		JP 2001078790 A 27-03-2001	
		KR 148693 B1 01-08-1998	
		US 5234809 A 10-08-1993	
		ZA 9002190 A 24-12-1991	